



STATE INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE OF THE P.R.C.

Title: Separation method of buffering stem cell in human Placenta

Priority Information			
Application Number	03123504	Application Date	2003.05.09
Publication Number	1548529	Publication Date	2004.11.24
International Classification	C12N5/08 C12Q1/02	(Applicant(s)) Name	Inst. of Preclinical Medicine, PLA Academy of Military Medical Sciences
Address	Zhang Yi,Li Changdong,Jiang Xiaoxin	Inventor(s) Name	
Patent Agency Code			Patent Agent

Abstract

The present invention discloses the separation method of mesenchymal stem cell in human placenta. On the basis of past separation of tissue cell, the present inventor separates from placenta mesenchymal stem cell with high purity via perfusion process based on the special anatomical structure of placenta. Identification result shows that the mesenchymal stem cell separated from placenta has the biological characteristic and polydirectional differentiation capacity as the reported mesenchymal stem cell of marrow. Owing to the infantile cell component and wide source of placenta, like cord blood, the present invention will have wide clinical application foreground.



[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12N 5/08
C12Q 1/02



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03123504.2

[43] 公开日 2004 年 11 月 24 日

[11] 公开号 CN 1548529A

[22] 申请日 2003.5.9 [21] 申请号 03123504.2

[71] 申请人 中国人民解放军军事医学科学院基础
医学研究所

地址 100850 北京市海淀区太平路 27 号

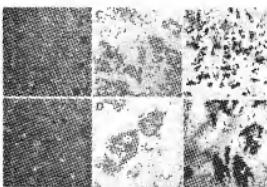
[72] 发明人 张毅 李长东 江小霞 何津
刘元林 张双喜 吴英 毛宁

权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 4 页

[54] 发明名称 一种人胎盘间充质干细胞的分离方
法

[57] 摘要

本发明公开了一种人胎盘间充质干细胞的分离方法。本发明的发明人在总结以往分离组织细胞的基础上，利用胎盘特殊的解剖结构，采用灌流法，成功自胎盘中分离获得纯度较高的 MSC。鉴定结果表明从胎盘中分离的间充质干细胞与以往报道的骨髓间充质干细胞具有相同的生物学特性和多向分化能力。由于胎盘与脐血一样，细胞成分较幼稚，来源广泛，方便易得，因此在临幊上将具有广泛的应用前景。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种分离人胎盘间充质干细胞的方法，包括以下步骤：

- (1) 在无菌条件下，自脐血管插入导管形成循环液体灌流系统；
- (2) 先用灌流液通过动静脉循环将残留的血液洗出，然后用灌流液孵育；
- (3) 从灌流液中分离单个核细胞，进行培养；
- (4) 用胰酶消化传代进行鉴定。

2、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于所述的灌流液为含抗凝剂的培养基。

3、根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于所述的抗凝剂为肝素。

4、根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于所述的培养基为 DMEM 或 IMDM 培养基。

5、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于从灌注液中分离单个核细胞采用离心的方法实现。

6、根据权利要求 5 所述的方法，其特征在于从灌注液中分离单个核细胞采用密度梯度离心的方法实现。

7、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于从灌注液中分离的单个核细胞用 MSC 培养基进行培养。

8、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于分离的细胞鉴定包含生物学特性鉴定及多向分化潜能鉴定。

9、根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于分离的细胞的生物学特性鉴定包含细胞生长特点及形态学特点鉴定，流式细胞术鉴定 MSC 表面标志，胎盘 MSC 细胞周期的分析，胎盘 MSC 生长曲线的绘制及对数生长期倍增时间的测定。

10、根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于分离的细胞的多向分化潜

能鉴定包含成脂肪诱导、成骨诱导和成软骨诱导。

一种人胎盘间充质干细胞的分离方法

技术领域

本发明涉及一种细胞的分离方法，具体地说涉及一种人胎盘间充质干细胞的分离方法。

背景技术

人间充质干细胞（mesenchymal stem cell, MSC）是最早自骨髓中分离出的一类具有多向分化潜能及自我更新能力的组织干细胞，来源于胚胎发生期的中胚层，在体内和体外特定条件下可向成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌细胞、肌腱细胞、肝细胞甚至神经胶质细胞分化（1. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res. 1991; 9:641-650. 2. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999; 284:143-147.）。MSC 易于从骨髓中分离纯化，进行有效的体外扩增，对其生物学作用研究结果表明，MSC 具有改善骨髓微环境，促进造血移植后造血重建的作用（1. Kadereit S, Deeds LS, Haynesworth S, et al. Expansion of LTC-ICs and Maintenance of p21 and BCL-2 Expression in Cord Blood CD34+/CD38- Early Progenitors Cultured over Human MSCs as a Feeder Layer. Stem cell.2002; 20:573-582. 2. Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. J Clin Oncol. 2000; 18: 307-316. 3.

Klyushnenkova E,Mosca J,McIntosh K. Human mesenchymal stem cells suppress allogeneic T cell responses in vitro:implications for allogeneic transplantation. Blood. 1998; 92: 642a.)。免疫特性方面，MSC 不表达或仅表达可忽略水平的 MHC II 类分子，不相关供者的 MSC 不引起异体淋巴细胞反应，能下调异体免疫反应 (1. McIntosh K,Klyushnenkova E,Shustova V,et al. Suppression of alloreactive T cell reaponse by human mesenchymal stem cells involves CD8+ cells. Blood. 1999; 94: 133a. 2. Klyushnenkova E,Shustova V,Mosca J, et al. Human mesenchymal stem cells induce unresponsiveness in preactivated but not native alloantigen specific T cells. EXP Hematol. 1999; 27: 122.)。基于上述特征，使其从发现后迅速成为在细胞治疗、基因治疗中有效发挥作用的理想工程细胞，以及组织工程尤其是骨或软骨组织损伤修复中重要的种子细胞。

目前所报道的 MSC 主要来源于骨髓，采用密度梯度离心法获得。虽然分离方法简便，但供者取髓需经历一个比较痛苦的手术，并在取材过程中及取材后会有很高的感染机会；由于人体骨髓中 MSC 的含量极其稀少，每 $10^5 \sim 10^6$ 个单个核细胞中大约只有 1 个，且随着年龄的增加，骨髓中 MSC 的数量、增殖和分化能力均显著下降 (Rao MS, Mattson MP. Stem cells and aging: expanding the possibilities. Mech Ageing Dev. 2001; 122:713-734.)，使其在研究和应用尤其是临床应用中受到限制。

最近，已有具有干祖细胞特性的间充质细胞自包括骨、软骨、肌肉、腱等组织中分离出来 (1.Ralf H. Isolation of Primary and Immortalized CD34—Hematopoietic and Mesenchymal Stem Cells from Various Sources. StemCells. 2000; 18: 1-9. 2.Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. Exp Hematol. 2000; 28: 875-884.)，这些组织有一个共同的特征就是来源于胚胎发育期的中胚层。

起源于胚胎发育期胚外中胚层的胎盘是由间质、血管及滋养细胞组成，含有大量的间充质成分。在胚胎发育时期，胚外中胚层的多能干细胞可能有少量的未被招募发生分化，而以静止形式存在于胎盘组织中，如果能从胎盘中分离培养出 MSC，将为实验研究和临床应用开辟一个崭新而丰富的来源。2000 年美国血液学年会，Jaroscaak 等报道采用酶消化法，将胎盘组织用手术剪刀剪碎，加组织酶消化一定时间后，过滤获得细胞悬液，接种于培养基中，经过一段时间培养后，可见培养瓶中有贴壁细胞，继续培养，获得的胎盘贴壁细胞采用流式细胞术检测细胞表面标志，结果显示获得的胎盘贴壁细胞与骨髓 MSC 在细胞表面标志染色特性上没有明显区别，但胎盘贴壁细胞是异质性的，细胞表面标志 SH2，SH3，SH4 等为阳性；不表达 CD45，PECAM，提示其为非造血细胞及内皮细胞，说明胎盘中存在 MSC 成分（Jaroscaak J, Smith T, Haynesworth S, et al. Preliminary characterization of the surface staining of placental derived adherent cells:A potential new source of stroma for umbilical cord blood (UCB) expansion. THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, December 1-5, 2000.）。2002 年日本学者 Watanabe 等采用酶消化法或组织培养法结合流式细胞术分选法从胎盘中分离出 MSC，具体方法主要为将胎盘组织剪碎，组织酶消化或直接组织块培养，流式细胞仪分选所需细胞，继续培养一段时间后，进行细胞生物学鉴定并诱导细胞向成脂肪、成骨和成软骨分化，进一步诱导细胞向神经细胞分化（Watanabe N, Igura K, Nagamura-Inoue T, et al. Multilineage potential of human placenta-derived mesenchymal cells. THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, December 1-5, 2002）。但是上面所述的分离方法均较为繁琐。

发明内容

本发明的目的是公开一种简便的分离人胎盘间充质干细胞（MSC）的方法，该方法包括以下步骤：

按照胎盘的解剖结构，在无菌条件下，自脐血管插入导管形成循环液体灌流系统。用含肝素的 DMEM 或 IMDM 培养基作为灌流液。先用灌流液通过动静脉循环将残留的血液洗出，然后用灌流液孵育。采用密度梯度离心法从灌流液中分离单个核细胞，洗涤后用 MSC 培养基悬浮所获细胞，进行培养。待散在细胞形成克隆后，将各克隆细胞挑出用 MSC 培养基分别培养，细胞 80~90% 融合后，用胰酶消化传代，将传至 3 代以上的细胞于液氮中冻存，并进行细胞的生物学特性及多向分化潜能鉴定。

细胞的生物学特性鉴定进行了细胞生长特点及形态学特点鉴定，流式细胞术鉴定 MSC 表面标志，胎盘 MSC 细胞周期的分析，胎盘 MSC 生长曲线的绘制及对数生长期倍增时间的测定。

胎盘 MSC 多向分化潜能鉴定进行了成脂肪诱导、成骨诱导和成软骨诱导。

实验结果说明，从胎盘中分离的贴壁细胞与以往报道的骨髓间充质干细胞具有相同的生物学特性和多向分化能力，即从人胎盘中成功分离、纯化、获得间充质干细胞。

目前 MSC 主要采用手术法抽取供者骨髓，密度梯度离心分离单个核细胞，接种于 MSC 专用培养基中培养获得。该法操作繁琐，供者在取髓中和取髓后均有感染的可能。发明人在总结以往分离组织细胞的基础上，利用胎盘特殊的解剖结构，采用灌流法，成功自胎盘中分离获得纯度较高的 MSC。

该法简便易行，且由于胎盘与脐血一样，细胞成份较幼稚，来源广泛，方便易得，因此本发明的方法在临幊上将具有广泛的应用前景。

附图说明

图 1 为细胞生长形态学镜下观察。其中

A 为培养 3d 后可见散在的贴壁细胞

B 为 7~10d 形成克隆

C 为经筛选克隆形成致密贴壁细胞

D 为瑞氏姬姆萨染色

图 2 为流式细胞术鉴定 MSC 表面标志结果。

图 3 为胎盘 MSC 细胞周期的分析结果。

其中 P3 为培养第三代细胞的 DNA 含量，分析细胞周期，可见大部分细胞处于静止期（G0/G1 期，96.66%），极少细胞处于增殖期（S 期，3.25%）。

P6 为培养第六代的细胞的 DNA 含量，分析细胞周期，可见大部分细胞处于静止期（G0/G1 期，96.35%），极少细胞处于增殖期（S 期，2.54%）。

图 4 为细胞生长曲线图。

图 5 为胎盘 MSC 多向分化潜能鉴定的成脂肪诱导细胞图。

其中 A 为诱导 3d，对照组细胞形态

B 为诱导 3d，实验组细胞形态发生改变

C-D 为诱导 7d，可见胞浆内脂滴形成

E-F 为油红染色脂滴被特异性染成红色

图 6 为胎盘 MSC 多向分化潜能鉴定的成骨诱导细胞图。

其中 A 为诱导 1w，对照组细胞形态

B 为诱导 1w，实验组细胞形态发生改变

C 为诱导 2w，原位染色显示碱性磷酸酶表达阳性

D 为诱导 2w，涂片染色显示碱性磷酸酶表达阳性

E-F 为诱导 4w，von Kossa 染色显示骨结节形成

图 7 为胎盘 MSC 多向分化潜能鉴定的成软骨诱导细胞图。

其中 A 为诱导 2w，对照组细胞 Alcian blue 染色

B 为诱导 2w，实验组细胞 Alcian blue 染色

C-D 为高倍镜下可见 II 型胶原形成细胞外基质被特异性染成蓝色

具体实施方式

实施例一 胎盘 MSC 分离培养方法

按照胎盘的解剖结构，在无菌条件下，自脐血管（2 条脐动脉和 1 条脐静脉）插入聚乙烯导管形成循环液体灌流系统，用含肝素的 DMEM 或 IMDM 培养基作为灌流液。先用灌流液通过动静脉循环将残留的血液在产后 0.5~2.5 h 内洗出，然后用 100~250ml 灌流液 20~25℃ 孵育 12~24h。采用密度梯度离心法从灌流液中分离单个核细胞，洗后用 MSC 培养基悬浮所获细胞，37℃、5%CO₂ 全湿条件下培养 24~48h 后，换液去除未贴壁悬浮细胞，继续培养，每隔 3~4d 换液一次。待早期散在细胞形成克隆后，将各克隆细胞挑出用 MSC 培养基分别培养，细胞 80~90% 融合后，用 0.25% 胰酶消化，1:3 或 1:4 传代，将传至 3 代以上的细胞用于以下实验，并于液氮中冻存部分细胞以备后用。

实施例二 胎盘 MSC 的生物学特性鉴定

一、细胞生长特点及形态学特点

通过实施例一方法培养，约需 3d，镜下可见散在呈纺锤形贴壁细胞，7~10d 左右形成放射状克隆，将各克隆分别挑出至 24 孔板单独培养。待细胞纯化至 3 代后，用于细胞生物学特性检测。培养过程中，发现这种细胞形态相对均一，增长速度快，贴壁速度快，易被胰酶消化，传代至 15 代以上，其形态及生长特点亦无明显改变。见图 1。

二、流式细胞术鉴定 MSC 表面标志

分别取第 3、6、9、12、15 代细胞，流式细胞术检测表面标志，动态观察培养过程中表面标志的变化。消化收集细胞，计数后取 5×10^6 个，分装 10

管； PBS 洗一次，1500rpm 离心 10 min；弃上清，残留 100~200 μ l，吹打混匀细胞；加入 PE 标记的 CD34、CD73、CD166 抗体和 FITC 标记的 CD45、CD105、HLA-DR、UEA-1 抗体和间接标记的 CD29、CD44 抗体各 10 μ l，并设一管为空白对照，一管为二抗对照；4℃，避光反应 30 min；PBS 洗一次，1500rpm 离心 10 min；直接标记的细胞弃上清，加入 200 μ l PBS 吹打混匀细胞，200 μ l 的 1% 多聚甲醛固定，置 4℃ 待测，3d 内上流式细胞仪检测。间接标记的细胞需与二抗反应后，重复上述步骤后上机检测。

流式细胞仪检测细胞的表面标志，动态观察来源于各克隆的第 3、6、9、12、15 代细胞，无明显改变。不表达造血细胞表面标志即 CD34（HSPC 及内皮细胞阳性）、CD45（白细胞阳性）、HLA-DR（MHC-II 类分子）持续阴性，CD29 和 CD44（纤维蛋白和透明脂酸盐的受体，基质细胞表达），CD73（即 SH-3、4）、CD105（即 SH-2）、CD166（间充质细胞表达）和 UEA-1（内皮细胞的表面标志）持续为阳性。经 3 代以上传代后，细胞成分均一，纯度在 95% 以上。见图 2。

三、胎盘 MSC 细胞周期的分析

细胞长至 80-90% 融合时，消化收集细胞约 1×10^6 个，PBS 洗一次，加入 70% 的乙醇固定，4℃ 待测。检测时，先离心去乙醇，再用 PBS 洗一次，加入 RNaseI 500u，37℃ 反应 30 min，PBS 洗一次，加入 碘化丙啶（PI，终浓度 50 μ g/ml）1ml，室温避光反应 20 min，上机检测细胞 DNA 含量。

经测定第 3 代和第 6 代细胞的 DNA 含量，细胞周期分析，G0/G1 期、S 期和 G2M 期所占比例分别为 96.35%、96.66%，1.11%、0.09%，和 2.54%、3.25%。结果提示体外培养的细胞具有典型的干细胞增殖特点，即只有少数组细胞处于活跃的增殖期（1.11%、0.09%），大部分的细胞处于静息期（96.35%、96.66%）。见图 3。

四、胎盘 MSC 生长曲线的绘制及对数生长期倍增时间的测定

取对数生长期细胞，消化计数，以 10%FBS 的 LG-DMEM 培养基制成细胞悬液 ($2 \times 10^4/\text{ml}$)，24 孔板中每孔接种 0.5ml，37°C，5%CO₂，饱和湿度下培养。每天取 3 复孔，台盼蓝染色后计数活细胞数，计算平均值，连续观察 7d。以培养时间为横轴，细胞数为纵轴，绘制细胞生长曲线。以 Patterson 公式计算细胞在对数生长期的倍增时间，即 $T_d = T \lg 2 / \lg(N_t/N_0)$ ， T_d : 倍增时间 (h)，T: 细胞由 N_0 增至 N_t 所用的时间 (h)，N: 细胞数。

通过每天细胞计数的结果绘制细胞生长曲线，计算倍增时间。由细胞生长曲线可以看出，细胞在第 2-4d 处于指数生长期。根据公式计算出第 5 代细胞在指数生长期的倍增时间分别为 22.6h。见图 4。

实施例三 胎盘 MSC 多向分化潜能鉴定

一、成脂肪诱导

3 代以上 MSC，按 $1 \times 10^5/\text{孔}$ 接种于六孔板，标准培养基培养 24h 后换用含 10%经筛选 FBS 的高糖 DMEM，并加入地塞米松 1 μM、消炎痛 200 μM、IBMX 0.5mM、胰岛素 10 μg/ml，每 3d 半量换液，共诱导 2w，油红 O 染色鉴定脂滴形成。

在含 10%经筛选 FBS 的 DMEM-HG，加入地塞米松 1 μM、消炎痛 200 μM、IBMX 0.5mM、胰岛素 10 μg/ml 培养 3d，细胞即发生形态改变，由纺锤形的成纤维细胞样逐渐收缩变短，90%以上细胞成为立方形或多角形；连续培养 7d，镜下可见细胞内有微小脂滴出现，随着培养时间的延长，脂滴逐渐增大并融合，至培养 2w 时，可见融合成团的脂滴充满整个细胞。油红 O 染色可见细胞内产生的脂肪被特异性染成红色。见图 5。

二、成骨诱导

3 代以上 MSC，按 $1 \times 10^5/\text{孔}$ 接种六孔板，用标准培养基培养 24h 后换用含 10%经筛选 FBS 的 DMEM-HG 并加入地塞米松 0.1 μM、抗坏血酸磷酸盐

50 μM、 β -磷酸甘油 10mM，每 3 天半量换液，共诱导 2-4 周。碱性磷酸酶染色鉴定成骨细胞形成，Von Kossa 染色鉴定骨结节形成。

在含 10%经筛选 FBS 的 DMEM-HG，加入地塞米松 0.1 μM、抗坏血酸磷酸盐 50 μM、 β -磷酸甘油 10mM 培养 1w，细胞形态发生明显的改变，由纺锤形的成纤维细胞样变为多角形，类似于神经元细胞样，细胞周边出现长丝状突出，并可向周围延伸。继续培养 2w 以上后，细胞基质中出现钙化斑，矿化物逐渐出现，并且开始形成多层小结结构，至培养 4w 后，可见明显钙化结节。2w 碱性磷酸酶染色呈强阳性反应，达到 95%以上，而未加以诱导的对照组则大部分为阴性，只有不到 5%显示为弱阳性，表明细胞已向成骨细胞转化。von Kossa 染色可将骨结节中沉积的钙染成黑色，诱导组可见大量的黑色骨结节，有明显的立体结构，而对照组在任何时间都没有阳性反应。见图 6。

三、成软骨诱导

3 代以上细胞，低速离心使细胞在试管中形成微团，在含 2.5% FBS 的 DMEM-HG 中加入胰岛素、转铁蛋白、亚硒酸钠各 6.25 μg/ml，BSA 1.25 μg/ml，丙酮酸钠 1mM/L，抗坏血酸磷酸 37.5 μg/ml，TGF-β 1 50ng/ml，每 3d 半量换液，连续培养 2w。

诱导 2 w 后将细胞微团打散涂片，Alcian blue 染色可见 II 型胶原形成细胞外基质呈蓝色，对照组无蓝染。见图 7。



图 1

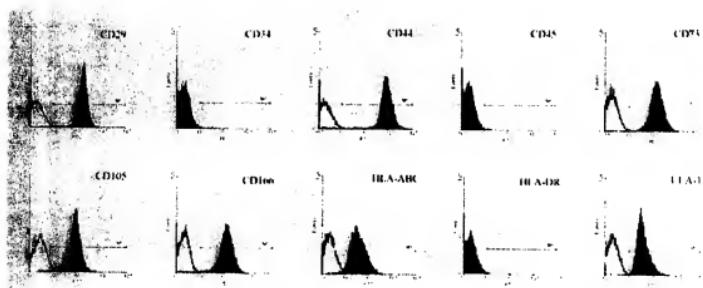


图 2

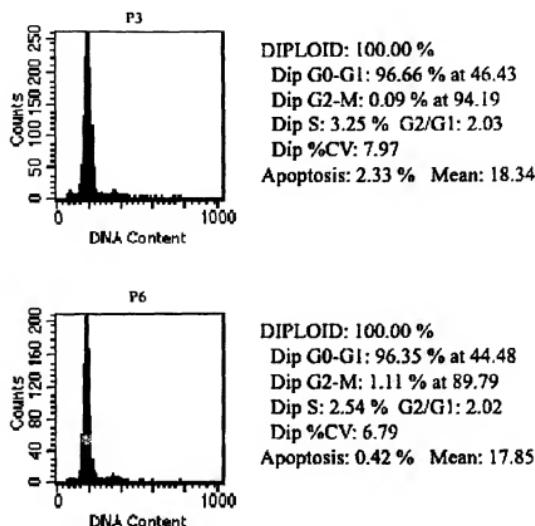


图 3

生长曲线

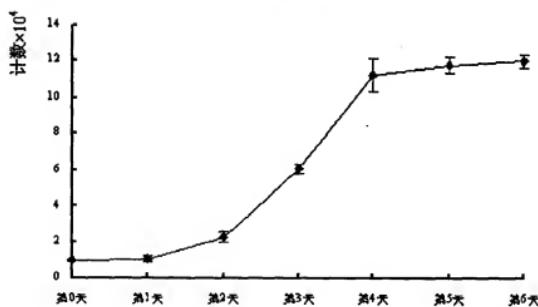


图 4

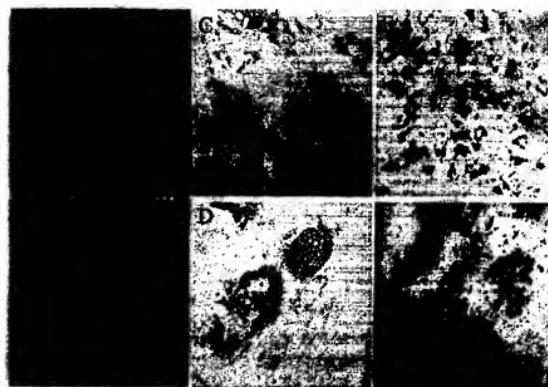


图 5

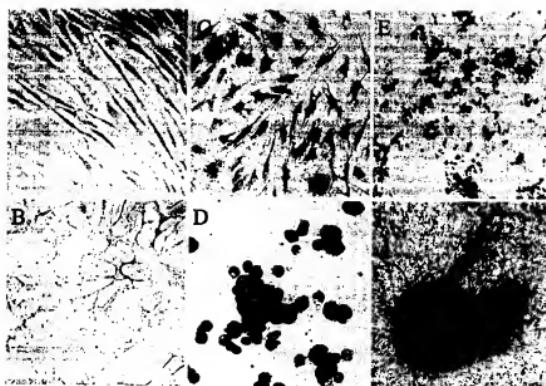


图 6

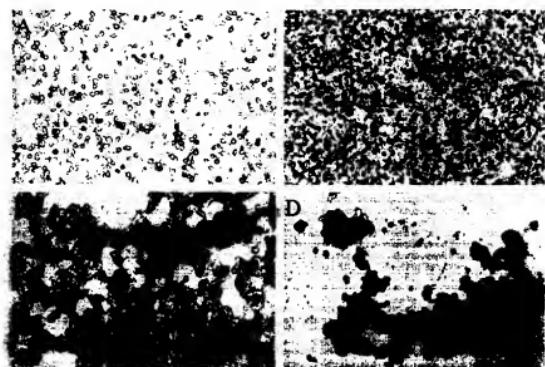


图 7